栗田子郎*: **日本産ハナヤスリ科胞子外膜彫紋の走査型電子顕微鏡による研究 (1)****

Siro KURITA*: Studies on the spore coat ornamentation of Japanese Ophioglossaceae by scannig electron microscope (1)

ハナヤスリ科の植物の多くは，その単純な外部形態のため，種のレベルでの分類が容易でない。そこで，胞子の形質，とくに外膜彫紋のそれをこのレベルの分類の指標に用いようとする試みが19世紀末からなされてきた。Plantle (1884), Hara (1934), Clausen (1938), Knox (1951), Verma (1958), Mahabare (1962), Panigrahi & Dixit (1969), Pant & Khare (1971), Goswami & Khandelwal (1973), Pant & Misra (1975) などがこの例である。

日本に於ては Hara (1934) がオオハナヤスリ *O. vulgatum* が粗い網状の彫紋をもつことで，当時この種の生態型の一つとみられていたハマハナヤスリ *O. thermale* と明確に区別し得ることを指摘したのが始まりである。その後，Nishida (1959) や Sahashi (1969, 1980) の研究がなされた。とくに Sahashi (1977) は SEM と LM からの知見をもとに，シダ学会で「ハナヤスリ科の胞子の形態による種の分類の試み」という講演をおこなっている。Kurita (1979) もまた日本植物学会と日本花粉学会に於て，胞子形成過程の SEM による観察結果に基礎をおき，その形態の種特異性について報告している。

本論文では，日本産種の胞子外膜彫紋のより細密な観察を通し，この形質の分類学的指標としての有効性についての考察を試みた。

材料と方法 日本産のハナヤスリ属6種1変種とコブラン属1種の胞子を観察した。ただし Kurita & Nishid (1965) により明らかにされている奇数倍数性あるいは異数性に起因する，減数分裂異常の cyto-races は除外した。種名と産地，染色体数は以下のとうりである。

チャボハナヤスリ *O. parvum* Nishida et Kurita: 東京都青ヶ島，及び静岡県掛川市産。いずれも n=120 である。

コハナヤスリ *O. thermale* Komarov var. *nipponicum* (Miyabe et Kudo) Nishida: 東京都小金井市産，及び八丈町産，n=240; 千葉県一宮町産，n=480.

ハマハナヤスリ *O. thermale* Komarov: 千葉県富津市産，n=240.

---

* 千葉大学理学部生物学教室系統学研究研究室. Laboratory of Phylogenetic Botany, Faculty of Science, Chiba University, Chiba.

** 本研究の一部は文部省科学研究費補助金 No. 554219 によってなされた。千葉大・理・生物・系統学研究室業績番号 80.

オオハナヤスリ *O. vulgatum* L.: 千葉県成田市産，n=240.

トネハナヤスリ *O. namegatae* Nishida et Kurita: 茨城県取手市産，n=240.

コヒロハハナヤスリ *O. petiolatum* Hook.: 千葉県我孫子市産，n=480.

サクラジマハナヤスリ *O. kawamurae* Tagawa: 鹿児島県桜島産，染色体数は不明。このサクラジマハナヤスリは1938年7月3日に土井美夫氏が採集したものをFAAで固定した液浸標本で，1952年10月10日に故田川基二先生が西田誠氏におくられたものである。また Sahashi (1980) がサクラジマハナヤスリだとした青ヶ島産のやはり染色体数不明の個体の胞子も観察した。この個体は佐橋氏が1976年に採集され，ニューカマー液で固定し筆者にゆずられたものである。

コブラン *O. pendulum* (L.) Pr.: 沖縄県西表島産，染色体数は不明。

サクラジマハナヤスリは液浸標本から，コブランは腊葉標本から採取した胞子のみを用いたが，その他の種の胞子は栽培中の株から，完熟を待って採取したものを観察した。またコハナヤスリ，ハマハナヤスリ，オオハナヤスリおよびコヒロハハナヤスリでは上記以外の産地からの腊葉標本から採取した胞子も比較のため観察した。

サクラジマハナヤスリ以外の胞子は二つの異なる方法で作製した試料を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し比較した。第一の方法は，デシケーター内で乾燥させた胞子を粘着テープをつけた試料台に直接散布し，これをイオンスパッタリング装置内に入れ，1.2KV で8分間金被覆をほどこすものである。第二の方法は酸解法を用いるものであるが，通常の酸解法 (Erdtman, 1960) では膨潤度が大きすぎるため，無水酢酸の代りに氷酢酸を入れた酸解液を使用した。90°C ないし 100°C で10分間酸解し，冷却後ただちに3000回転で遠沈させ，次に氷酢酸に移し同様に遠沈させた。水洗，遠沈を3回おこない，水を捨てた後，胞子を白金耳で取り出し，粘着テープをつけた試料台に分散させ，デシケーター内で乾燥させた。金による被覆は第一の場合と同様におこなった。観察に用いた加速電圧は 5, 15, 25KV の3段階であるが，2000倍前後での走査には15KV が最適であった。写真はすべてこの電圧下で撮影した。

胞子の赤道径の測定と平均値の算定には，300倍で撮影した写真を基に50個の胞子を用いた。文中の記号Mはその平均値を，Sは標準偏差を表す。遠心極面の凹所底部の小孔の散布密度や，その他の形質の計測値は10個の胞子のそれの平均値である。また，外膜彫紋の記述に用いた用語は主に Kremp (1965) と Radoford et al. (1974) によった。今日使用されている胞子の彫紋の記載用語は主に光学顕微鏡像に基づくものなので，SEM 像を記載するには不適当なものも少なくない。そのため本論文では，誤解をさけるためにできるだけ具体的な表現で記述するように努めた。

観察結果　観察した胞子に共通する主な形質は次のようである。

1. 異型極性 (heteropolar)。2. 放射相称的 (radiosymmetric)。3. 三条形 (trilate)。4. 条溝 (laesulae) は溝ではなく，crest 状に隆起している。5. 極からみた外形 (amb)

は円形。6. 外膜彫紋 (ornamentation) は光学顕微鏡下では，いろいろな程度の網目状であるが，走査電子顕微鏡下では擂鉢状のクレーターが密集しているようにみえる。つまり胞子は表面を密にクレーター様構造で被われた球体として認識される。

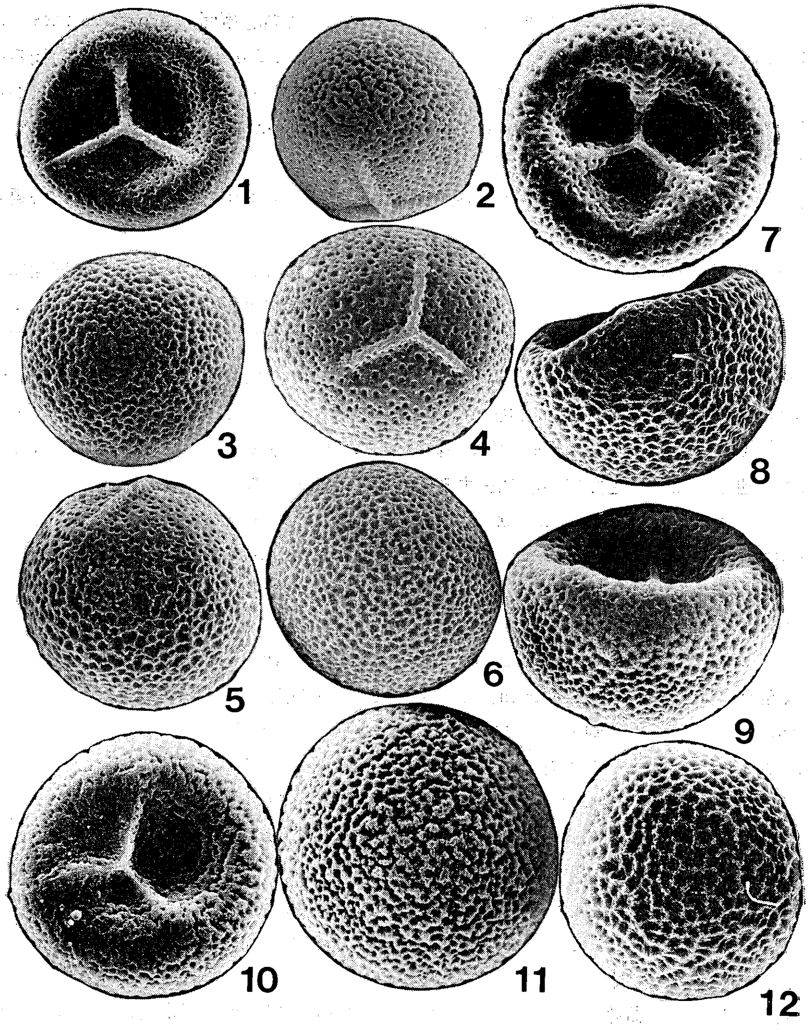

Fig. 1. Spores of *O. parvum* (1-6), *O. thermale* var. *nipponicum* (7, 8, 12) and *O. thermale* var. *thermale* (9-11). 1-3, 7-12: Naturally air dried spores. 4-6: Acetolyzed spores. Figs. 1-6, ×1080; figs. 7-12, ×1174.

しかし，上記の諸形質も細部では種内および種間で，量的にも質的にも変化する。以下に7種1変種の胞子形質を記述し，それに基づき考察を試みる。

1.　チャボハナヤスリ　*O. parvum* Nishida et Kurita

胞子の大きさは掛川産のものが M=31.0 μm，S=2.3 μm であり，八丈町のものは M=32.5 μm，S=2.4 μm であった。図1に示すように向心極面 (proximal face) は foveolate で，直径 1 μm 前後の凹所が散在する。幅約 1.7 μm，長さ 12 μm 前後の条溝は commissure と margo とをはっきりと区別し得ない。条溝の高さは 1 μm から 2 μm である。側面と遠心極面 (distal face) は foveo-reticulate ないし rugulate である。遠心極面の muri の幅は 0.4 μm から 1.0 μm で，これに囲まれた lumina は擂鉢状の凹所となっている。muri が分断し，lumina が連結することも多く，この場合は rugulate になる。

図1—1～3および図2—2～5で明らかなように，muri と lumina の表面には 0.15 μm 以下の微細顆粒が多量に存在する。だがこの顆粒は酸解処理をすることにより，その大部分が溶解し消失する（図1—4～6，および図2—6）。擂鉢状の凹所の底には普通一個の直径 0.2 μm 以内の小孔があるが，まれには2個の場合もある（図2—6）。murus の幅と lumen の広さは同一子のう穂内の胞子においてもかなりの変異をみせるが（図2—2～5），murus，が太い場合は lumen が狭まく，細い場合は広くなる。だが，遠心極面の一定面積内に存在する凹所底部の小孔の数はかなり一定しており，チャボハナヤスリでは 60(±10)/100 μm^2 であった。なお，外部形態がこの種と極似する *O. nudicaule* の胞子は全く形態が異なる (Kurita and Nishida，未発表)。図2—1は *O. nudicaule* の胞子外膜だが，muri の幅や顆粒の量などからみてチャボハナヤスリのそれとは明確に区別できる。

2.　コハナヤスリ　*O. thermale* Kom. var. *nipponicum* (Miyabe et Kudo) Nishida

4倍体については別報 (Kurita，投稿中) で詳しく論じているので，ここでは主に8倍体について述べる。胞子の大きさは一宮産のもので M=37.2 μm，S=1.8 μm であった。図1—7に示すように向心極面は foveolate であり，条溝は幅 1.5 μm 前後，長さ 10 μm 前後，高さ 1 μm 前後である。側面および遠心極面は foveo-leticulate であり (図1—8・12)，その murus の幅と rumen の広さにはチャボハナヤスリの場合と同程度の変異が観察された（図3—2～6）。全般的にみれば向心極に近い部分の murus の幅は約 1 μm で，遠心極面では狭くなり 3 μm～1.0 μm の ridge を形成する。しかし，図3—6のように幅広い muri をもつものもあった。図3—3・4に示されるものがこの種に一般的な彫紋である。

表面に散在する顆粒は ridge の部分にあるものが 0.15 μm～0.25 μm で，擂鉢状の凹所の斜面から底面に付着するそれは 0.10 μm 以下である。これらの粒子は，やはり酸解処理により消失する。処理後の胞子外膜構造は基本的にはチャボハナヤスリと同じ

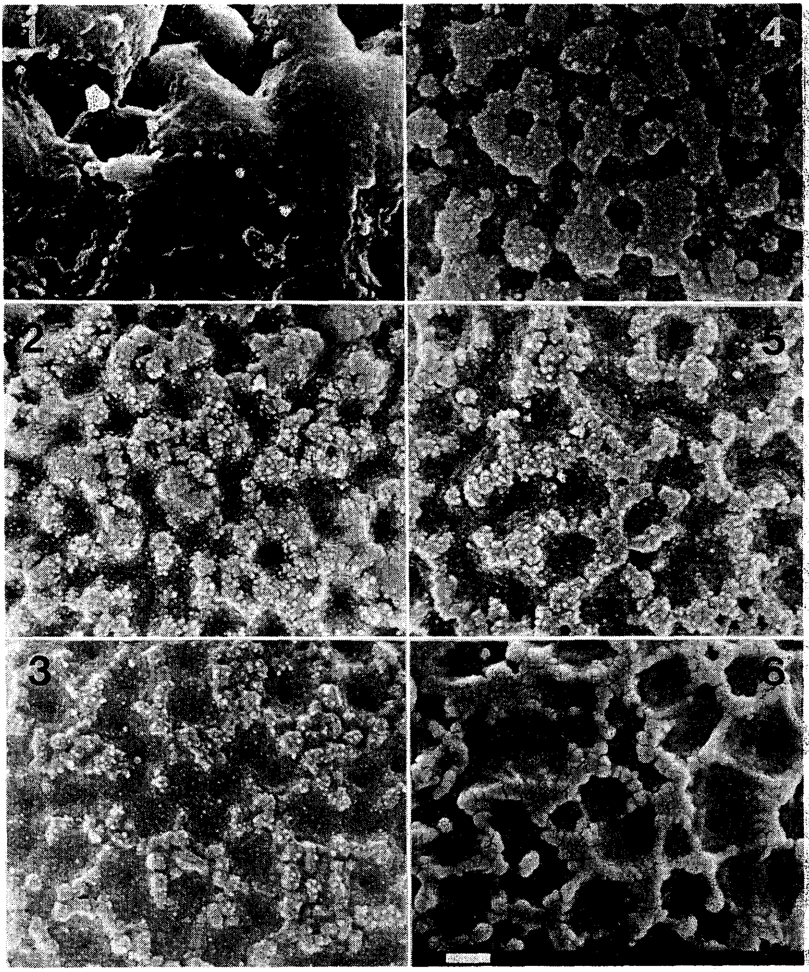

Fig. 2. Sporecoat ornamentation of distal face of *O. nudicaule* (1) and *O. parvum* (2–6). White bar indicates 1 μm. 2 to 5 show individual variation of ornamentation in a spike. 6 shows an acetolyzed spore coat. Most lumina have one small pit which does not perforate spore wall.

である。

図3—1は小金井市産の4倍体の外膜彫紋であるが，8倍体と同様である。だが ridge の幅が約 0.5 μm と狭いために lumina が広くみえる。全体としてみれば，4倍体の方が彫紋の変異の幅がせまい。遠心極面の 100 μm^2 にある小孔の数は両者とも 40 (±10) 個で，チャボハナヤスリのそれより少ない。

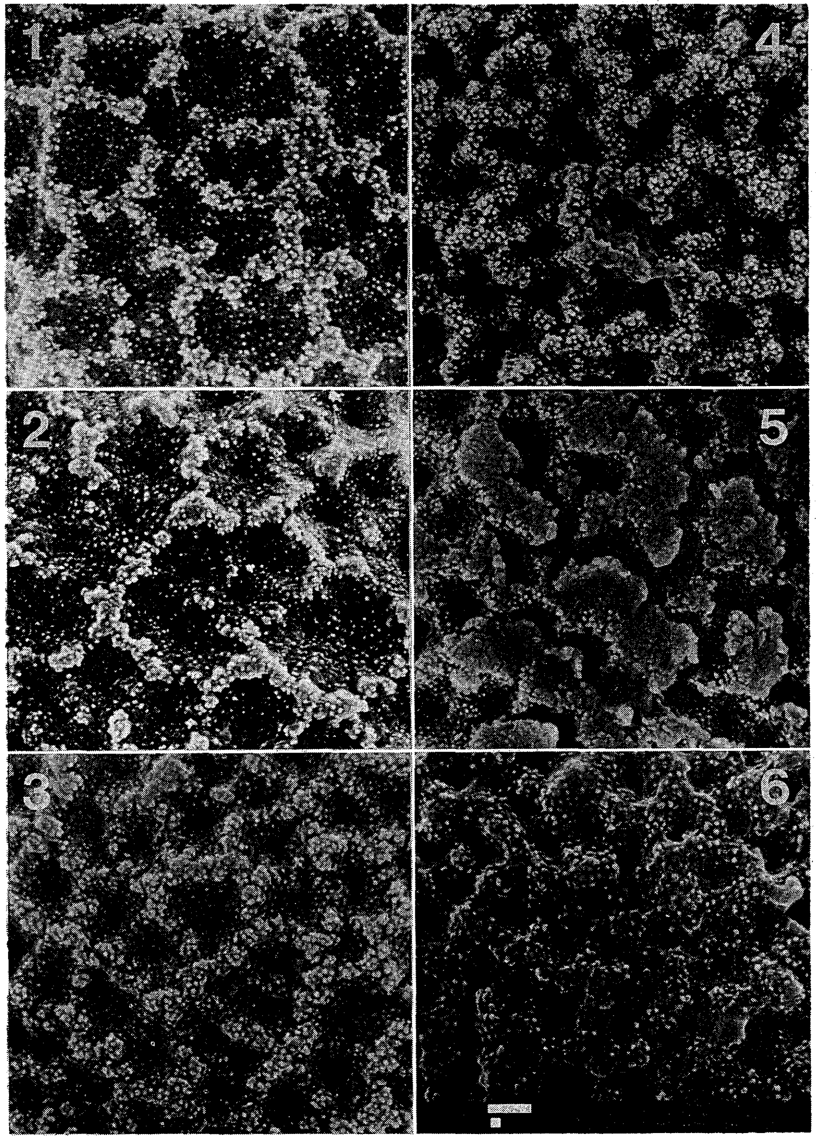

Fig. 3. Variation of spore coat ornamentation of distal face of *O. thermale* var. *nipponicum*. 1. Spore coat of a tetraploid taxa (n=240) from Koganei, Tokyo. 2-6. Spore coat of an octoploid taxa (n=480) from Ichinomiya, Chiba pref., showing individual variation in a spike; 3 and 4 show the most common type of ornamentation of this species.

3.　ハマハナヤスリ　*O. thermale* Komarov

図1—9～11，図5—1・2示すようにコハナヤスリと同様で，区別し得ない。また小孔の分布密度のちがいを別とすれば，ヤボハナヤスリとの区別も困難である。富津産の胞子の大きさは M=35.8 μm, S=1.5 μm であった。

4.　オオハナヤスリ　*O. vulgatum* L.

胞子の大きさは成田市産のもので M=34.1 μm, S=1.8 μm であった。酸解処理をほどこさない胞子の向心極面（図4—1）は，幅 4 μm にも達する muri と狭いやせ尾根状になる muri とが入り混り，一見すると荒い網目状である。だが酸解処理をすると，直径 2 μm から 4 μm の，中央に複数の小孔のあるクレーターが点在する foveolate となる。muri に相当する部分には酸解後も直径 0.3 μm から 0.5 μm の顆粒が散在している（図4—4)。条溝は長さ約 2 μm，幅約 1.5 μm，高さ約 1 μm である。側面および遠心極面の彫紋は大変複雑である（図4—2・3)。高く隆起した ridge をもつ muri に囲まれた lumen の中が，さらにいくつかの低い ridge をもつ muri にかこまれた小さな lumen に分かれることが多い。ridge の幅は 2.5 μm に達するものから，0.2 μm と大変狭いものまである。高く隆起した ridge は2次電子の発生量が多いため，冠雪した尾根のようにみえる。また数は少ないが，平坦な高原状にみえる部分があり，ここには直径 0.3 μm から 0.4 μm ほどの顆粒が散在する（図4—3，図5—3・4)。酸解処理をほどこすと彫紋の様相が大きく変る（図4—5・6)。やせ尾根に相当する部分が融け去り，幅広い muri が露出する。このため胞子外形は，この種特有の歯車状から，滑らかな凹凸のある円形となる。1 μm から 2.5 μm の幅の muri に囲まれた，直径 2 μm から 8 μm に達する lumen は，その2重構造がより明確となる。それぞれの lumen は深皿状の凹所で，底部には複数の直径 0.3 μm から 1 μm の小孔がある。この小孔の辺縁はチャボハナヤスリなどのそれのように円形ではなく，長楕円形や卵形など様々である。また，酸解処理後の外膜は他の種のそれのように滑らかでなく，直径約 0.25 μm の顆粒が密に積重なったものとして観察された（図5—4)。

5.　トネハナヤスリ　*O. namegatae* Nishida et Kurita.

Sahashi (1969) が指摘したように，日本のハナヤスリ科のなかでは最も小さい胞子を形成する。取手産のものは M=26.5 μm, S=1.8 μm である。向心極面はコハナヤスリとオオハナヤスリとの中間的様相を程し，擂鉢状の凹所がまばらに点在し，直径0.25 μm 前後の顆粒で覆われた平坦部が目立つ（図4—7)。酸解するとこの顆粒のほとんどは消失し，表面は滑らかで foveolate となる（図4—8)。条溝は長さ 10 μm ないし 12 μm，幅 1.2 μm 前後，高さ 1 μm 前後である。側面および遠心極面の彫紋は，基本的にはコハナヤスリや次にのべるコヒロハハナヤスリのそれと同様である。幅 0.8 μm から 0.4 μm の muri に囲まれた，直径 1 μm から 3 μm の擂鉢状凹所が隣接しあい，網目の様をなすが，ところどころに約 6 μm^2 ほどの平坦部がみられるのが特徴で

ある。凹所中央の小孔は1個で，直径0.15 μm から 0.40 μm ほどである（図4－9・11，図5－5・6）。この小孔の分布密度は20(±5)/100 μm^2 である。表面に散在する，直径0.1 μm 以下の顆粒は酸解により消失するが，muri の ridge の構成要素であるところの直径0.2 μm から 0.5 μm の比較的大きな顆粒は残る（図4－10・12，図5－6）。

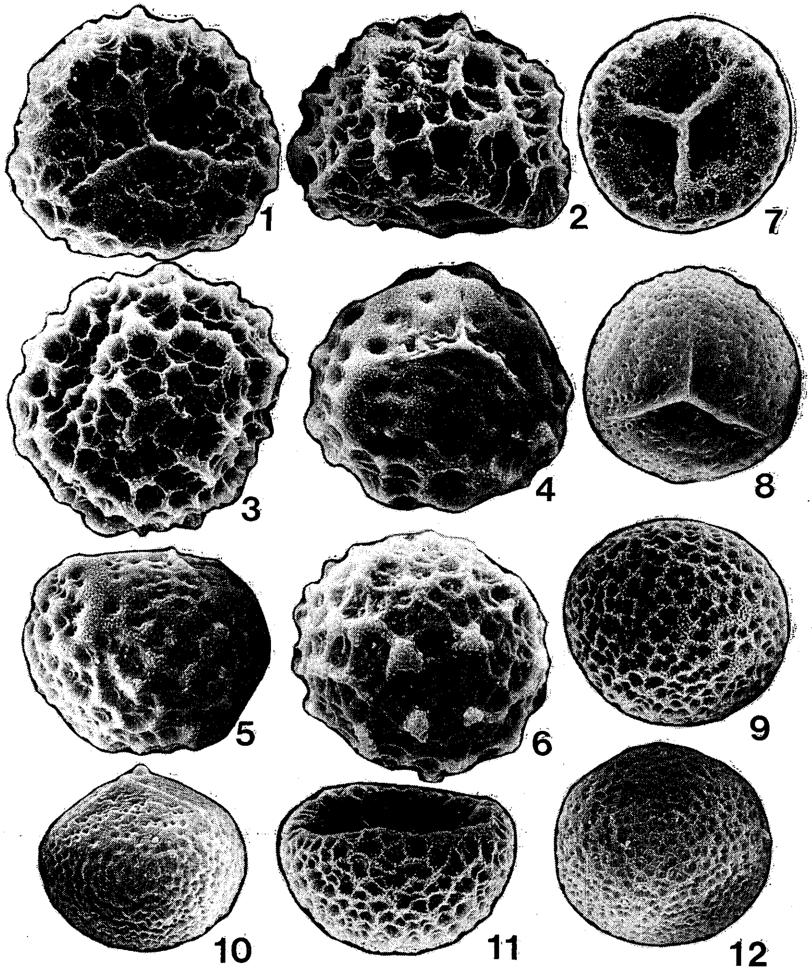

Fig. 4. Spores of *O. vulgatum* (1-6) and *O. namegatae* (7-12). 1-3, 7, 9, 11: Naturally air dried spores. 4-6, 8, 10, 12: Acetolysed spores. All figs. ×1174.